

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. November 2002 (07.11.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/087554 A2

-
- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 31/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/04410
- (22) Internationales Anmeldedatum:
22. April 2002 (22.04.2002)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
101 21 145.7 30. April 2001 (30.04.2001) DE
101 29 870.6 21. Juni 2001 (21.06.2001) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **IBIS GMBH BIO INNOVATIONEN [DE/DE]**; Erlenweg 7, 85764 Oberschleißheim (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **MAYER, Frank** [DE/DE]; Alte Dorfstrasse 34, 37120 Bovenden (DE).
- (74) Anwälte: **DEY, Michael usw.**; Weickmann & Weickmann, Postfach 860 820, 81635 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/087554 A2

(54) Title: ANTIBACTERIAL AGENT

(54) Bezeichnung: ANTIBAKTERIELLES MITTEL

(57) Abstract: The invention relates to the use of substances, binding to the bacterial translation factor EF-Tu, to prevent the formation of a cytoskeleton in bacterial cells and for production of anti-bacterial agents. The invention further relates to anti-bacterial agents, comprising partial sections of the amino acid sequences of the domains 2 and/or 3 of a bacterial EF-Tu protein, preferably with a length of 4-20 amino acids.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den bakteriellen Translationsfaktor EF-Tu binden, zur Hemmung des Aufbaus eines Cytoskeletts in Bakterienzellen und zur Herstellung antibakterieller Mittel. Weiterhin betrifft die Erfindung antibakterielle Mittel, die Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen der Domänen 2 und/oder 3 eines bakteriellen EF-Tu Proteins mit einer Länge von vorzugsweise 4-20 Aminosäuren enthalten.

Antibakterielles Mittel**Beschreibung**

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Substanzen, die an den bakteriellen Translationsfaktor EF-Tu binden, zur Hemmung des Aufbaus eines Cytoskeletts in Bakterienzellen und zur Herstellung antibakterieller Mittel. Weiterhin betrifft die Erfindung antibakterielle Mittel, die 10 Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen der Domänen 2 oder/und 3 eines bakteriellen EF-Tu-Proteins mit einer Länge von vorzugsweise 4-20 Aminosäuren enthalten.

Als antibakterielle Mittel wurden bisher unter anderem Penicillin oder 15 andere Antibiotika eingesetzt, welche ihre spezifische Hemmwirkung auf wachsende Bakterienzellen entfalten. Diese Wirkung beruht darauf, dass diese Antibiotika die beim Zellwachstum nötige Erweiterung des Peptidoglycangerüsts verhindern. Wachsende Zellen werden durch diese 20 Destabilisierung des Mureins entscheidend geschwächt. Bakterien in der stationären Phase werden nicht gehemmt, denn in dieser Phase erfolgt keine Erweiterung des Mureingerüsts.

Das bakterielle Protein EF-Tu enthält die Domänen 1, 2 und 3 (Song, H., Parsons, M.R., Rowell, S., Leonard, G., Phillips, E.V., J. Mol. Biol. 285, 25 1245-1256, 1999). Die Sequenzen des Proteins EF-Tu und seines kodierenden Gens sind für *Escherichia coli* und eine Reihe anderer Eubakterien publiziert und in Datenbanken zugänglich. Hier wird auch beschrieben, dass die Domäne 1 von EF-Tu bei der Proteinsynthese eine Rolle spielt.

30

Die mögliche Existenz eines prokaryotischen permanenten Cytoskeletts wurde in Naturwissensch. 85, 1998, 278-282 (Mayer et al.) diskutiert.

- 2 -

Eine Beteiligung des bakteriellen Proteins EF-Tu an der Ausbildung eines solchen Cytoskeletts war jedoch nicht bekannt.

Bisher ist in der Literatur (vgl. z.B. Schilstra, M.J., Slot., J.W. van der Meide, P.H., Posthuma, G., Cremers, A.F., Bosch, L.: Immunocytochemical localization of the elongation factor Tu in *Escherichia coli* cells., Biochem. Biophys. Acta **1291**, (1996), 122-130) im Hinblick auf die Anordnung von EF-Tu in Bakterienzellen davon ausgegangen worden, dass EF-Tu praktisch homogen im Cytoplasma verteilt ist. Bei bisherigen Versuchen wurde dabei wohl nicht berücksichtigt, dass künstlich hergestellte EF-Tu-Fibrillen in vitro durch Kälte depolymerisiert werden können.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass in prokaryotischen Zellen ein Cytoskelett vorliegt, welches mit Anti-EF-Tu-Antikörpern angefärbt werden kann. Dieses Cytoskelett umfasst ein Netzwerk von Proteinfibrillen, das sich nahe der zum Cytoplasma gerichteten Oberfläche der cytoplasmatischen Membran und durch das Cytoplasma verlaufend befindet. Die cytoplasmatische Membran und der periphere Teil dieses Netzwerks können als 2 konzentrische Hohlröhren angesehen werden, wobei die cytoplasmatische Membran die äußere der beiden Röhren darstellt, der periphere Teil des Netzwerks (Cytoskelett) die innere Röhre. Durch das Cytoplasma verlaufende Fibrillen ergänzen und stabilisieren das System und sind Ansatzstellen für Ribosomen. Ribosomen konnten auch am peripheren Teil des Cytoskeletts, orientiert in Richtung Cytoplasma, nachgewiesen werden.

Das prokaryotische Cytoskelett weist somit mehrere Varianten auf:

- Varianten, welche spezielle Funktionen vermitteln, bestehend aus Proteinen, welche dem Actin von höheren Zellen nahestehen und bei stäbchenförmigen Bakterien Länge und Durchmesser der Zelle definieren,

- 3 -

- Varianten, welche aus Proteinen bestehen, die dem Tubulin der höheren Zellen nahestehen und für die geregelte Zellteilung sorgen sowie
- eine generell bei allen Prokaryonten vorkommende Variante ("basic cytoskeleton"), welche aus einem Netzwerk von Protofilamenten des Proteins EF-Tu (elongation factor Tu) besteht, welche der Zelle als formstabilisierende Strukturelement dient und als Anheftungsstruktur für Ribosomen und andere komplexe Molekülaggregate fungiert. Die letzte Variante wird hierin auch als cytoskeletaltes Netzwerk bezeichnet.

EF-Tu ist ein Protein, welches 3 Domänen enthält, wobei Domäne 1 am Vorgang der Translation beteiligt ist. Für die Domänen 2 und 3 wurde bisher keine spezifische Funktion beschrieben. Nun wurde gefunden, dass die seitlich exponierten Epitope der Domänen 2 und 3 eine Passung bilden, wobei eine Oberfläche konvex und eine Oberfläche konkav ist. Es wird angenommen, dass diese Passungen die Ausbildung von EF-Tu-Polymeren, insbesondere linear aneinander gereihten Fibrillen, bewirken können und zwar sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Diese Fibrillen sind die Komponenten des Netzwerks, welches als Cytoskelett fungiert. Daraus kann abgeleitet werden, dass Substanzen, die an EF-Tu binden, insbesondere im Bereich der Domänen 2 oder/und 3, zur Hemmung des Aufbaus eines Cytoskeletts in Bakterienzellen und somit zur Herstellung eines antibakteriellen Mittels dienen können.

Das cytoskeletalte Netzwerk kann somit als Angriffspunkt (Target) für eine neue Klasse von Antibiotika herangezogen werden.

Insbesondere kann EF-Tu als Target-Protein für neue bakterielle Mittel dienen, welche die Passungsstellen auf Domäne 2 oder/und 3 besetzen können und dadurch den Aufbau von EF-Tu-Polymeren in der Zelle unterbinden, die für die Struktur der Bakterienzelle essenziell sind.

- 4 -

Diese Funktionsweise unterscheidet sich grundsätzlich von der Funktionsweise anderer auf EF-Tu-wirkender Antibiotika (vgl. z.B. Vogeley, L., Palm, G.J., Mesters, J.R., Hilgenfeld, R.: Conformational change of elongation factor Tu (EF-Tu) induced by antibiotic binding. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), 17149-17155). Dort wird gezeigt, dass bisher bekannte Antibiotika vom Kirromycintyp dadurch wirken, dass sie die Reversibilität einer Konformationsänderung an Domäne 1 verhindern, wobei sich die Domäne 1 in Richtung der Domäne 2 biegt, wenn GTP gebunden wird. Dieser Mechanismus ist grundsätzlich verschieden von dem hierin beschriebenen Wirkungsmechanismus einer Polymerisationshemmung bei dem die Domänen 2 und 3 involviert sind.

EF-Tu umfasst 394 Aminosäuren. Zur Domäne 1 gehören die Aminosäuren 8-204, wobei die Aminosäuren 172-204 eine Verbindungsstruktur zur Domäne 2 bilden. Zur Domäne 2 gehören die Aminosäuren 205-298 und zur Domäne 3 gehören die Aminosäuren 299-394.

Innerhalb der Domänen 2 und 3 treten unterschiedliche Sekundärstrukturen auf. Von besonderem Interesse sind dabei die Aminosäuresequenzen von 317 bis 328 und von 343 bis 354, welche in Domäne 3 liegen und Schleifen bilden, die frei in den Raum ragen und Kandidatensequenzen für eine Wechselwirkung mit Aminosäuresequenzen sind, welche in einer entsprechend positionierten Eindellung an der Peripherie von Domäne 2 liegen, wobei diese Sequenzen von Aminosäure 218 bis 224 reichen.

25

Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise festgestellt, dass man beim bakteriellen Cytoskelett generell durch Hemmung der Polymerisation von EF-Tu eine Zellschädigung erreichen kann. Eine solche Zellschädigung wird insbesondere auch bei gewöhnlichen Bakterienzellen, welche eine Zellwand besitzen erzielt. Die Erfindung ist insbesondere auf Eubakterien anwendbar.

- 5 -

- Die zur Hemmung des Aufbaus von Cytoskeletten verwendbaren Substanzen können unterschiedlichster Natur sein, sofern sie in der Lage sind, die Wechselwirkung zwischen Domäne 2 und Domäne 3 von zwei benachbarten EF-Tu-Molekülen zu hemmen. Geeignete Substanzen können beispielsweise durch ein Verfahren identifiziert werden, umfassend:
- 5 (a) Inkontaktbringen einer zu testenden Substanz mit bakteriellem EF-Tu oder einem zur Polymerisation fähigen Teilfragment davon, beispielsweise einem Fragment, welches die Domänen 2 und 3 enthält, und
 - 10 (b) Bestimmen, ob die Substanz die Ausbildung von EF-Tu-Polymeren hemmen kann.

Dieses Verfahren kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Bei einem *in vitro*-Verfahren werden vorzugsweise aufgereinigte EF-Tu-Moleküle bzw. geeignete Teilfragmente davon unter Bedingungen inkubiert, bei denen Fibrillenbildung stattfinden kann. Die Wirkung einer Testsubstanz auf die Fibrillenbildung lässt sich auf einfache Weise bestimmen, z.B. durch immunologische Anfärbung mittels markierter Anti-EF-Tu-Antikörper oder durch Verwendung von EF-Tu-Molekülen, die eine 20 Markierungsgruppe, z.B. eine Fluoreszenzmarkierungsgruppe tragen. Selbstverständlich kann das Verfahren auch *in vivo* durchgeführt werden, wobei die Wirkung der Zugabe einer Testsubstanz auf das Fibrillennetzwerk in einer Zelle durch immunologische Methoden, z.B. immunhistochemisch mit markierten Anti-EF-Tu-Antikörpern und mikroskopische Auswertung, 25 bestimmt werden kann.

Substanzen, welche die Ausbildung von EF-Tu-Polymeren hemmen, und die durch das oben beschriebene Verfahren erhältlich sind sowie davon abgeleitete Substanzen, z.B. durch empirische Derivatisierung oder/und 30 durch Computer-Modelling, können als pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Hilfs- oder/und Verdünnungsmitteln formuliert werden.

- 6 -

Die pharmazeutische Zusammensetzung kann beispielsweise als Flüssigpräparat, Festpräparat, Emulsion oder Dispersion vorliegen. Die Verabreichung kann - je nach Präparat - durch Injektion, oral, rektal, nasal, topisch etc. erfolgen. Die Dosierung wird abhängig vom Wirkstoff, der 5 Verabreichungsform und der Art und Schwere der Erkrankung so gewählt, dass eine Bekämpfung von bakteriellen Infektionen möglich ist.

Die Wirkung des antibakteriellen Mittels kann unterschiedlicher Natur sein. Einerseits werden Substanzen verwendet, die direkt an die Passungsstellen 10 der Domänen 2 oder/und 3 von EF-Tu binden können. Andererseits können auch Substanzen verwendet werden, die an anderen Positionen des EF-Tu-Moleküls binden, jedoch einen hemmenden Einfluss auf die Passung nehmen und somit zu einer Unterbindung der Fibrillenbildung führen.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden peptidische, antibakterielle Mittel eingesetzt. Die peptidischen Mittel basieren auf Oligopeptiden, welche an EF-Tu, vorzugsweise im Bereich der Passungsstellen der Domänen 2 oder/und 3 binden. Diese Oligopeptide können Teilabschnitte der Aminosäure-Sequenzen der Domänen 2 oder/und 20 3 mit einer Länge von vorzugsweise 4 bis 20 Aminosäuren, besonders bevorzugt 5 bis 15 Aminosäuren und insbesondere bevorzugt mit einer Länge von 6-12 Aminosäuren enthalten. Diese Teilabschnitte sind in der Lage, an komplementäre Sequenzen der jeweils anderen Domäne zu binden, d.h. Sequenzen aus der Domäne 2 sind in der Lage, an Domäne 3 zu binden und Sequenzen aus Domäne 3 sind in der Lage, an Domäne 2 zu binden.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die Substanzen, welche an EF-Tu binden, Teilabschnitt der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 2 mit einer Länge von mindestens 4 und insbesondere mindestens 5 Aminosäuren, insbesondere Teilabschnitte im Bereich der Domäne 2 der Aminosäuren 218 bis 224 und gleichzeitig keinen Abschnitt der den

- 7 -

Bereich der Aminosäuren 317 bis 328 oder/und dem Bereich der Aminosäuren 343 bis 354 von Domäne 3 von EF-Tu entspricht. Alternativ sind Substanzen bevorzugt, welche Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen aus der Domäne 3 mit einer Länge von mindestens 5 Aminosäuren, insbesondere von mindestens 5 Aminosäuren, besonders bevorzugt mindestens 6 Aminosäuren enthält und keine Teilabschnitte entsprechend den Aminosäuren 218 bis 224 von Domäne 2 umfasst. Solche Abschnitte können beispielsweise "truncated" EF-Tu sein, welche ausschließlich aus der Domäne 3 ohne die Domänen 1 und 2 oder ausschließlich aus den Domänen 1 und 2 ohne die Domäne 3 bestehen. Ein solches EF-Tu-Bruchstück konkurriert in der Zelle mit den von der Zelle synthetisierten eigenen natürlichen EF-Tu-Proteinmolekülen und sorgt bei seinem Einbau in das aufpolymerisierende Protofilament für einen Kettenabbruch, da jeweils die zweite für die Kettenverlängerung erforderliche Domäne fehlt. Dadurch bildet sich kein intaktes Netzwerk mehr. Dies ist gleichbedeutend mit dem Verlust der Lebensfähigkeit der Bakterienzelle. Eine Störung der Ausprägung des Netzwerkes in der Bakterienzelle beeinflusst Form und Verhalten der Bakterienzelle negativ, wie durch Versuche festgestellt werden konnte. Der negative Einfluss auf Form und Verhalten der Zelle stellt einen Hinweis auf den zu erwartenden Zelltod dar, der bei Anwendung des erfindungsgemäßen Antibiotikums eintritt.

Anstelle des beschriebenen "truncated" EF-Tu-Bruchstücks kann auch ein Antibiotikum eingesetzt werden, bei welchem eine Verhinderung der Polymerisierung von EF-Tu-Proteinmolekülen, also ein Kettenabbruch durch andere Mittel erzielt wird, beispielsweise durch das Vorhandensein von Abschnitten, welche die Anbindung von weiteren EF-Tu-Proteinmolekülen verhindern.

30

Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Antibiotika besteht darin, dass nur eine geringe Gefahr zur Entstehung bakterieller Resistenz gegen

- 8 -

diese neue Klasse von Antibiotika besteht. Eine Resistenz würde bedeuten, dass das Bakterium ein ins Zellinnere eingeschleustes Peptid abbauen würde. Würde das geschehen, könnte das Bakterium nicht vermeiden, sein strukturell gleiches eigenes Peptid, welches ja Bestandteil des zelleignenen 5 EF-Tu-Proteins darstellt und welches für die Translation von größter Bedeutung ist, mit abzubauen.

Die antibakteriellen Mittel können lineare oder cyclische peptidische Verbindungen oder Peptidomimetika umfassen. Peptidische Verbindungen 10 können aus natürlichen L- α -Aminosäuren, andererseits jedoch auch aus anderen Aminosäuren, z.B. D- α -Aminosäuren, Azaaminidsäuren, β -Aminosäuren, nicht genetisch kodierten L- oder/und D- α -Aminosäuren etc. oder Kombinationen davon aufgebaut sein. Die Herstellung von Peptidomimetika ist beispielsweise in RIPKA, A.S., RICH, D.H. (1998) 15 Peptidomimetic design, Curr. Op. Chem. Biol. 2, 441-452, beschrieben.

Weiterhin können die peptidischen Verbindungen oder Peptidomimetika gebundene hydrophobe Gruppierungen, die den Transfer durch die cytoplasmatische Membran erleichtern oder Gruppierungen mit großer 20 Raumerfüllung, welche die Anlagerung weiterer EF-Tu-Moleküle und so die Ausbildung eines Polymerisationsprodukts behindern, enthalten. Weiterhin können die antibakteriellen Mittel Gruppen mit Schutzfunktion gegen einen Abbau tragen.

25 Die antibakteriellen Mittel können gegen beliebige prokaryotische Organismen und Archaea, insbesondere pathogene Organismen, eingesetzt werden. Sowohl gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien als auch Mykoplasmen besitzen ein auf EF-Tu-basierendes Cytoskelett und können daher durch das erfindungsgemäße Mittel bekämpft werden. Beispielsweise 30 können antibakteriellen Mittel gegen Vancomycin-resistente Keime, z.B. Staphylococcen, eingesetzt werden.

- 9 -

Für die neue Klasse von Antibiotika ergibt sich somit ein breites Anwendungsspektrum. Es wurde festgestellt, dass diejenigen Bereiche, welche für die Bindung der Monomeren zur Ausbildung der Protofilamente zuständig sind, bei allen untersuchten Bakterien bezüglich ihrer 5 Aminosäuresequenz sehr ähnlich sind. EF-Tu ist in diesen Bereich hoch konserviert. Auch die Abstände dieser Bereiche voneinander in einem gegebenen EF-Tu-Molekül, also die Abstände der exponierten Bereiche der Domänen 2 und 3 sind, ausgedrückt in der Anzahl von Aminosäuren, identisch, wobei immer 126 Aminosäuren zwischen den konservierten 10 Bereichen liegen.

Die erfindungsgemäßen Antibiotika zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und insbesondere sehr geringe Nebenwirkungen aus. Große EF-Tu-Sequenzen treten in der menschlichen Zelle außer in Mitochondrien 15 nicht auf. Die mitochondrialen EF-Tu-ähnlichen Sequenzen sind durch die Doppelmembran der Mitochondrien gegen das Antibiotikum weitestgehend geschützt.

Weiterhin soll die Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und 20 Beispiele erläutert werden.

Die **Figur 1** zeigt die makromolekulare Architektur des Bakterienproteins EF-Tu, in dem die Domänen 1, 2 und 3 näher bezeichnet sind. Dieses bakterielle Protein EF-Tu kann sich bei der Polymerisation zu periodisch gebauten Fibrillen zusammenlagern, wie in **Figur 2** gezeigt ist. 25

Figur 3 zeigt eine schematische Darstellung der Polymerisation an den mit + oder - bezeichneten, reaktiven Bindungsbereichen der Domäne 2 und 3.

30 Die **Figur 4** zeigt eine Vergrößerung (Vergrößerung: ca. 1,5 Millionen) einer elektronenmikroskopischen Aufnahme einer *in vivo* polymerisierten, isolierten Fibrille aus EF-Tu-Proteinmolekülen. Oberhalb der punktierten

- 10 -

Linie befinden sich die Domänen 1, unterhalb davon die aneinanderlagerten Domänen 2 und 3.

Wird die Polymerisation des EF-Tu-Proteins an den in Figur 3 mit + und - bezeichneten Bindungsbereichen durch Zugabe eines Überschusses an Partikeln, enthaltend Teilabschnitte der Aminosäure-Sequenz der Domänen 2 oder 3, zurückgedrängt, so wird das Überleben der betroffenen Bakterienzelle unmöglich gemacht, weil die Zellstruktur zusammenbricht.

Beispiel:

- Es wurden Versuche mit dem gram-positiven Bakterium *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* EM1 (im Folgenden abgekürzt als EM1) und dem wandlosen Bakterium *Mycoplasma pneumoniae* (im Folgenden abgekürzt als Mp) durchgeführt, welche belegen, dass diese Bakterien ein permanentes Cytoskelett auf Basis von EF-Tu besitzen.
- Die Versuche umfassen die Identifizierung und zelluläre Lokalisation von Kandidaten-Proteinen für ein solches bakterielles Cytoskelett durch Anwendung von Anti-Actin-Antikörpern (hergestellt gegen Actin der höheren Zelle), deren mehr oder weniger starke Kreuzreaktivität mit bakteriellen Proteinen darauf beruht, dass es bei Bakterien bekanntermaßen Proteine gibt, welche zur Actin-Superfamilie gehören, ohne auffällige Sequenzhomologien mit Actin der höheren Zelle aufzuweisen. Prokaryonten haben keine ausgesprochenen Actin-Gene.
- Neben Immunelektronenmikroskopie mit den oben genannten Antikörpern an Ultradünnsschnitten durch Bakterien wurden auch "Whole mount"-Techniken verwendet. Es wurde durch die Kombination dieser Techniken gefunden, dass sich nahe der zum Cytoplasma gerichteten Oberfläche der cytoplasmatischen Membran und durch das Cytoplasma verlaufend ein Netzwerk aus Proteinfibrillen befindet, dessen Komponenten mit den Anti-Actin-Antikörpern kreuzreagieren. Cytoplasmatische Membran und der peripherer Teil dieses Netzwerks bilden formal zwei konzentrische Hohlröhren, wobei die cytoplasmatische Membran die äußere der beiden Röhren darstellt, der peripherer Teil des Netzwerks (Cytoskelett) die innere. Durch das Cytoplasma verlaufende Fibrillen ergänzen und stabilisieren das System und sind Ansatzstellen für Ribosomen. Ribosomen setzen sich auch an den peripheren Teil des Cytoskeletts, orientiert Richtung Cytoplasma.

- 12 -

Mit Hilfe der French-Presse wurden die Zellen von EM1 aufgeschlossen und mit dem gewonnenen Material (lösliche Fraktion, partikuläre Fraktion) SDS-Gelelektrophorese und Western-Blotting durchgeführt. Im SDS-Gel wurden mehrere definierte Banden erhalten, von denen eine Bande (bei ca. 43 kDa)
5 sowohl mit Anti-Actin-Antikörpern als auch mit Anti-EF-Tu-Antikörpern, gewonnen gegen EF-Tu von Mp, anfärbbar war. Diese Bande trat verstärkt dort auf, wo als Material für die SDS-Gelelektrophorese die partikuläre Fraktion des Zellaufschlusses, gewonnen durch niedrigtourige Zentrifugation, verwendet worden war. Die Anti-EF-Tu-Antikörper wurden
10 benutzt, weil bei 43 kDa üblicherweise EF-Tu zu finden ist (es macht bis 9 % der Proteinmasse eines Bakteriums aus), weil EF-Tu zur Actin-Superfamilie gehört, und weil EF-Tu in großer Menge in einer prokaryotischen Zelle vorkommt.

15 Die Rolle von EF-Tu als Baukomponente eines bakteriellen Cytoskeletts ist neu. Aus dieser Eigenschaft des EF-Tu als Baukomponente für ein komplexes Netzwerk, wie es das Cytoskelett darstellt, kann abgeleitet werden, dass die Bakterienzelle hierfür eine große Proteinmenge einsetzen muss. Ein Vergleich des Baus dieses bakteriellen Cytoskeletts mit dem der höheren Zelle macht deutlich, dass auch das bakterielle Cytoskelett aus mehreren Proteintypen aufgebaut sein dürfte. EF-Tu ist eine Hauptkomponente. Bei der höheren Zelle ist zwar nicht EF-Tu an der Ausbildung des Cytoskeletts beteiligt (die höhere Zelle besitzt kein EF-Tu), jedoch ist bekannt, dass hier eine große Zahl unterschiedlicher Proteine
20 zum Cytoskelett beiträgt.
25

Es gelang zu zeigen, dass die am Schnitt und bei Whole mount mit Anti-Actin-Antikörpern reagierenden Komponenten des oben bezeichneten Netzwerks des Cytoskeletts auch intensiv mit Anti-EF-Tu-Antikörpern
30 reagierten.

- 13 -

- Diese Reaktion erfolgte bei Mp an der gesamten, durch Triton-Behandlung (Entfernen der cytoplasmatischen Membran) freigelegten, jetzt in Richtung Außenwelt exponierten, ursprünglich verdeckten Oberfläche. Die Kontrolle, hergestellt unter Verwendung von Zellen, welche nicht mit Triton, 5 ansonsten jedoch gleich behandelt waren und somit nicht die cytoplasmatische Membran verloren hatten, zeigten keine Markierung. In diesem Kontrollversuch kaschierte also die cytoplasmatische Membran die potenziellen Bindungsstellen für EF-Tu.
- 10 Die durch Entfernen der cytoplasmatischen Membran freigelegte Oberfläche ist der periphere Teil des Cytoskeletts der Zelle. Nicht exponiert sind in dieser Situation innere Zellbestandteile, wie z.B. Ribosomen, von denen gezeigt ist, dass sie im Verlauf der Translation die Anheftungsstellen für das eine Hilfsfunktion ausführende EF-Tu sind (EF-Tu agiert hierbei mit 15 seiner Domäne 1). Daraus wurde geschlossen, dass im Verlauf der Translation nicht das EF-Tu zum Ribosom geht, sondern das Ribosom zum EF-Tu, welches ja, in seiner Eigenschaft als Komponente des Cytoskeletts, räumlich fixiert ist auf die Zellperipherie und auf quer durch das Cytoplasma verlaufende Fibrillen.
- 20 Das Vorkommen eines permanenten bakteriellen Cytoskeletts konnte weiterhin in den Eubakterien *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Ralstonia eutropha* und *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* sowie in den Archaea *Methanococcus jannaschii* und *Methanococcus voltae* 25 nachgewiesen werden.

Ansprüche

1. Verwendung von Substanzen, die an EF-Tu binden, zur Hemmung
5 des Aufbaus eines Cytoskeletts in Bakterienzellen.
2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen im Bereich der Domäne 2 (Aminosäuren 205-
10 298) oder/und der Domäne 3 (Aminosäuren 299 bis 394) an EF-Tu
binden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
15 dass die Substanzen im Bereich der Aminosäuren 218 bis 224 von
Domäne 2 an EF-Tu binden.
4. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
20 dass die Substanzen im Bereich der Aminosäuren 317 bis 328
oder/und 343 bis 354 von Domäne 3 an EF-Tu binden.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass die Substanzen Teilabschnitte der Aminosäuresequenzen aus
den Domänen 2 oder/und 3 mit einer Länge von 4 bis 20
Aminosäuren enthalten.
6. Verwendung nach Anspruch 5,
30 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die Teilabschnitte eine Länge von 5 bis 15 Aminosäuren,
insbesondere von 6 bis 12 Aminosäuren aufweisen.

- 15 -

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Substanzen ausgewählt werden aus linearen oder cyclischen
peptidischen Verbindungen oder Peptidomimetika.

5

8. Verwendung nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass die peptidischen Verbindungen oder Peptidmimetika gebundene
hydrophobe Gruppierungen, Gruppierungen mit großer Raumerfüllung
oder/und Gruppen mit Schutzfunktionen gegen Abbau enthalten.

10

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung
eines antibakteriellen Mittels.

15

10. Verwendung nach Anspruch 9,
dadurch gekennzeichnet,
dass das antibakterielle Mittel als pharmazeutische
Zusammensetzung gegebenenfalls zusammen mit pharmazeutisch
üblichen Träger-, Verdünnungs- oder/und Hilfsmitteln formuliert wird.

20

11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10 zur Herstellung eines Mittels
gegen gram-positive oder gram-negative Bakterien.

25

12. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10 zur Herstellung eines Mittels
gegen Mycoplasmen.

13. Antibakterielles Mittel, enthaltend die Teilabschnitte der Aminosäure-
Sequenzen der Domänen 2 und/oder 3 des bakteriellen Proteins EF-
Tu mit einer Länge von 4 bis 20 Aminosäuren.

30

14. Antibakterielles Mittel nach Anspruch 13, enthaltend Teilabschnitte
mit einer Länge von 5 bis 15 Aminosäuren.

- 16 -

15. Antibakterielles Mittel nach Anspruch 13 oder 14, enthaltend Teilabschnitte mit einer Länge von 6 bis 12 Aminosäuren.
16. Antibakterielles Mittel nach einem der Ansprüche 13 bis 15,
5 dadurch gekennzeichnet,
dass es an die Teilabschnitte gebundene hydrophobe Gruppierungen,
Gruppierungen mit großer Raumerfüllung und/oder Gruppierungen
mit Schutzfunktion gegen Abbau enthält.
- 10 17. Antibakterielles Mittel nach einem der Ansprüche 13 bis 16,
formuliert als pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls
zusammen mit pharmazeutisch üblichen Träger-, Verdünnungs-
oder/und Hilfsmitteln.
- 15 18. Verfahren zur Identifizierung neuer antibakterieller Wirkstoffe,
umfassend:
 - (a) Inkontaktbringen einer zu testenden Substanz mit bakteriellem
EF-Tu oder einem zur Polymerisation fähigen Teilfragment
davon und
 - 20 (b) Bestimmen, ob die Substanz die Ausbildung von EF-Tu-
Polymeren hemmen kann.
19. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
25 dass es als *in vitro* - Test durchgeführt wird.
20. Verfahren nach Anspruch 18,
dadurch gekennzeichnet,
dass es als *in vivo* - Test durchgeführt wird.
30
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 20,
dadurch gekennzeichnet,

- 17 -

dass zum Bestimmen der Ausbildung von EF-Tu-Polymeren markierte Antikörper oder/und markierte EF-Tu-Proteine oder polymerisierbare Teilfragmente davon verwendet werden.

- 5 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 18 bis 21,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass man eine Substanz, welche die Ausbildung von EF-Tu-
 Polymeren hemmt, oder eine davon abgeleitete Substanz, als
 pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls zusammen mit
10 pharmazeutisch üblichen Träger-, Verdünnungs oder/und Hilfsmitteln
 formuliert.

1/4

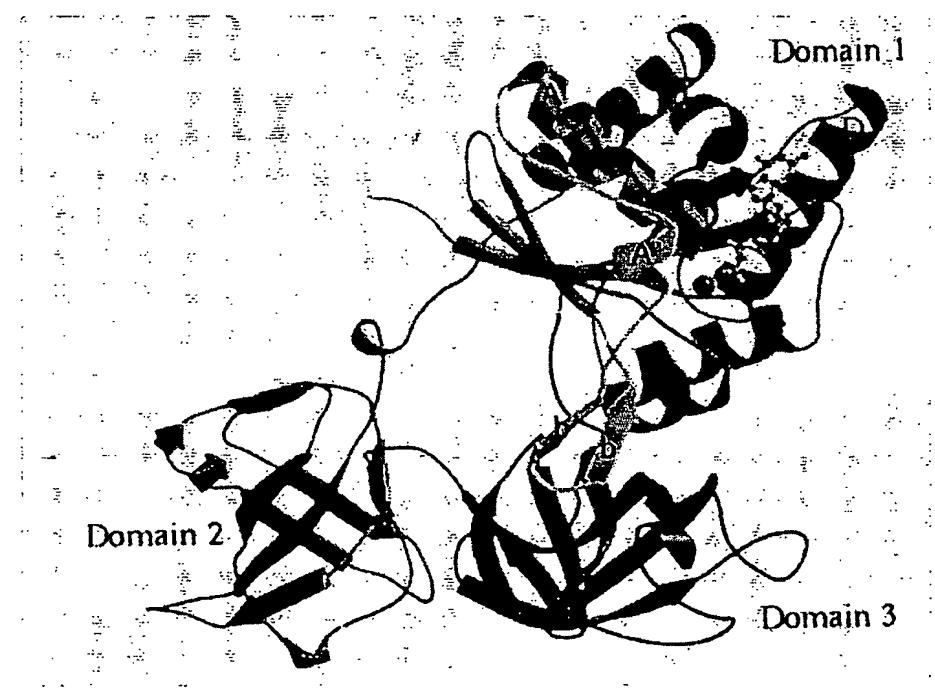


Fig. 1

2/4



Fig. 2

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

3/4

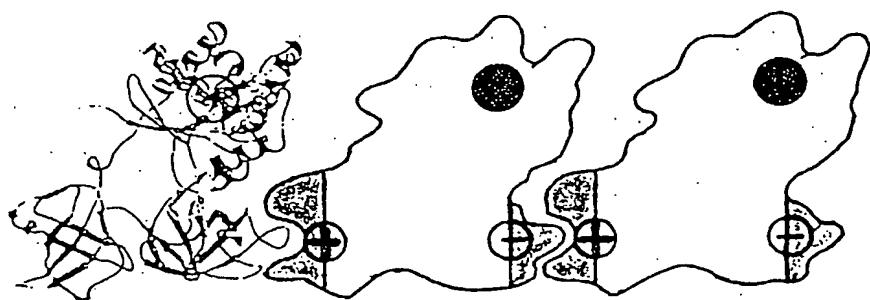


Fig. 3

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY

4/4



Fig. 4

ERSATZBLATT (REGEL 26)

BEST AVAILABLE COPY